Münster i/W. 1934. No 606 Med Diss.

Aus dem Hygienischen Institut
der Medizinischen Akademie zu Düsseldorf.
Direktor: Professor Dr. Manteufel.

Untersuchungen über das Verhalten des Milzbrandbazillus im Körper der weißen Maus.

*

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Würde eines doctor medicinae
durch die Medizinische Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster
in Gemeinschaft mit der Medizinischen Akademie
in Düsseldorf

vorgelegt von

Günter Hübel
aus Wuppertal-Vohwinkel.

1 . 9 . 3 . 3

Gedruckt in der Dissertationsdruckerei Robert Kleinert, Quakenbrück.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Akademie in Düsseldorf und der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster.

gez. i.V. Manteufel
Rektor der Medizinischen Akademie Düsseldorf.

gez.: von Szily
Dekan der Medizinischen Fakultät Münster.

gez.: Haag
1. Berichterstatter.

gez.: Jötten
2. Berichterstatter.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Meinen Eltern in Dankbarkeit!

Untersuchungen über das Verhalten des Milzbrandbazillus im Körper der weißen Maus.

Die Milzbrandinfektion zeigt bei den kleinen Nagetieren den Verlauf einer Sepsis. Trotz größter Virulenz für diese Versuchstiere wurde nie ein spezifischer Giftstoff gefunden, der die Erkrankung und das Sterben der Tiere erklären könnte. Dagegen läßt sich der Tod durch das massenhafte Auftreten der Keime in lebenswichtigen Organen und durch die Zerstörung dieses Gewebes erklären.

Die Vermehrung der Keime im Tierkörper erfolgt aber nicht gleichmäßig. Wyssokowitsch (13, S. 7—12), O. Bail (2, S. 222) und dessen Schüler Weil und E. Singer (9, 10, 11) konnten zeigen, daß intravenös zugeführte Bazillen rasch aus der Blutbahn verschwinden. Bail und Deutsch brachten große Mengen von Milzbrandbazillen in die Bauchhöhle von Meerschweinchen und konnten dann feststellen, daß diese rasch verschwanden und die Bauchhöhle dann längere oder kürzere Zeit keimfrei war, obwohl sich eine tödliche Sepsis anschloß. Der Infektionsort bleibt aber nahezu keimfrei (Bail 1, S. 111).

F. E. Haag (5, S. 58) hat im Jahre 1928 mitgeteilt, daß bei Meerschweinchen, die mit kleinen Mengen eines hochvirulenten Milzbrandstammes subkutan infiziert worden waren, die Bazillen an der Infektionsstelle zerfielen und bis 12 Stunden nach der Impfung spärlich durch Züchtung nachzuweisen waren. Dann entzog sich die Infektion dem Nachweis, indem typische Milzbrandbazillen erst 45 Stunden nach der Impfung wieder aufzufinden waren und zwar nunmehr in Milz, Leber, Netz, Herzendothel und Lunge, Blutbahn und Nieren waren in diesem Zeitpunkt noch frei. Die Kontrolltiere starben 47—48 Stunden nach der Impfung. Die subkutane Impfung zeigt demnach das gleiche Bild wie die intraperitoneale und die intravenöse Impfung. Haag führt diese Erscheinungen auf einen Formwechsel des Erregers zurück (4, 5).

Zu einer anderen Auffassung war Singer (11) gekommen. Er hatte ebenfalls Meerschweinchen subkutan infiziert. An der Impfstelle bildete sich ein starkes Oedem. 17 Stunden nach der Impfung mit größeren Milzbrandbazillen-Mengen konnte er aus diesem Oedem nur zwei Kolonien erhalten, sonst war weder histologisch noch kulturell in irgendeinem Organ ein besonderer Befund zu erheben. Nach 24 Stunden war das Oedem ausgebreitet und sulzig; es fanden sich nicht nur in diesem Oedem, sondern auch in verschiedenen Organen zahlreiche Bazillen. Da sich diese im weiteren Infektionsverlauf vor allem in der Milz und in den Lymphdrüsen fanden, so nimmt Singer an, daß der Verlauf der Milzbrandinfektion beim Meerschweinchen metastatisch, also durch sekundäre Vermehrungsherde erfolgt. Vor allem glaubte sich Singer zu dieser Auffassung durch weitere mühevolle Untersuchungen berechtigt, die ergaben, daß der Stichkanal nach der Impfung dicht mit Milzbrandbazillen und Leukocyten gefüllt bleibt.

F. E. Haag hat aber gezeigt (4, S. 309), daß der Infektionsverlauf je nach der Virulenz des Keimes und nach der Widerstandsfähigkeit des Wirtes ganz verschieden ist und wir sehen ja auch klinisch die Form der reinen Sepsis, die Form des lokalen subkutanen Oedems und die ganz begrenzte Form des Milzbrandkarbunkels. Die Bildung des starken Oedems an der Infektionsstelle, die Leukotaxis und die verlängerte Lebenszeit der Meerschweinchen im Versuch von Singer dürften dafür sprechen, daß sein Milzbrandstamm an Virulenz eingebüßt hatte. Herr Dr. Haag machte mich ferner auf folgendes aufmerksam: Vergleicht man in den Arbeiten Singers den Versuch 8 aus dem Jahre 1926 (5, S. 21) mit dem Versuch 3 aus dem Jahre 1927 (6, S. 286), so ergibt sich auch hieraus ein Beleg für eine Virulenzänderung. Obwohl Singer in beiden Fällen die gleichen Dosen zur Impfung benutzte, waren im Jahre 1926 schon nach 5 Stunden Bazillen in der Milz zu finden, 1927 aber nach 6 und nach 12 Stunden noch nicht, sondern erst nach 24 Stunden. Erst die Versuche aus dem Jahre 1927 gaben Singer die Infektionsbilder, aus denen er auf einen metastatischen Infektionsverlauf schloß.

Die Milzbrandstämme, mit denen Haag seine Milzbranduntersuchungen durchgeführt hat, haben im Laufe der Jahre ebenfalls an Virulenz eingebüßt, doch töteten sie Mäuse noch regelmäßig unter dem Bilde der septischen Infektion. Da Untersuchungen über den Verlauf der Milzbrandsepsis bei der weißen Maus noch fehlen, so wurden im folgenden die drei Fragen geprüft:

1. Wie ist das Verschwinden der Keime aus dem infizierten Gewebe zu deuten?
2. Wie ist der Bazillengehalt der Organe der weißen Maus während des Infektionsverlaufes?
3. Zeigen die Organe während der Inkubationszeit irgendwelche Besonderheiten?

1. Wie ist das Verschwinden der Keime aus dem infizierten Gewebe zu deuten?

Bail nahm an, daß der Milzbrandbazillus im Tierkörper Stoffe abgibt, die, ohne Vergiftungserscheinungen zu machen, die bakteriziden Kräfte des lebenden Organismus überwinden, bis dieser gegenüber der Bazilleneinschwemmung schutzlos ist. Diese Stoffe nannte Bail Aggressine. Im Körper des immunen Tieres befinden sich dagegen Antiaggressine, welche die Wirkung der Aggressine aufheben, so daß nunmehr die Abwehreinrichtungen des Wirtes zur Wirkung kommen. E. Singer (9, S. 288) sagt: „Das zuerst in geringer Menge gebildete Aggressin schafft die Bedingungen für eine Bakterienvermehrung. Die Bazillen sezernieren dann größere Mengen ihres Angriffsstoffes und so geht es weiter, bis der ganze Organismus von Aggressin und den ihm folgenden Bazillen überschwemmt wird." Singer zeigt dann in ausführlichen und eindeutigen Untersuchungen (9, 10), daß das retikuloendotheliale System der erste Angriffspunkt der Milzbrandbazillen im Tierkörper ist, daß dort eine Funktionsstörung schon kurz nach der Infektion einsetzt, die in eine eindeutige Lähmung übergeht. Zum Nachweis dieser Funktionsstörung im retikulo-endothelialen System machte Singer „Blockade"-Versuche: Die Aufnahme von Kongorot in das retikulo-endotheliale System war erschwert und verlangsamt, wenn dieses vorher durch Injektionen von kolloidalem Silber „blockiert" wurde. Die gleiche erschwerte Aufnahme von Farbstoff zeigte sich nach vorheriger „Blockade" mit Milzbrandbazillen.

Da schon 5 Stunden nach der Infektion Züchtungen aus Milz und Knochenmark gelingen, so ist anzunehmen, daß die Keime dort im retikulo-endothelialen System aufgefangen werden, das die Bazillen zwar restlos aufnimmt, aber diese infolge der Lähmung durch die Aggressine weder festhalten noch abtöten kann.

Wenn diese Auffassung auch nicht das verlangsamte Verschwinden der Keime von der Infektionsstelle bei immunisierten

(Baumgarten, Haag) und bei resistenten Tieren (Wyssokowitsch) erklären kann, so ist doch damit eine befriedigende Erklärung für das Verschwinden der Milzbrandbazillen im empfänglichen Tier geschaffen. Die injizierten Bazillen werden nach dieser Auffassung von den Histiozyten aufgenommen. Hier in den Zellen des retikulo-endothelialen Systems spielt sich der Kampf zwischen Angreifern und der zellulären Abwehr ab und, nachdem die letztere durch die Aggressine gelähmt ist, vermehren sich die Keime in ungestümer Weise.

Nun haben aber Haag und Schlüter (6) gezeigt:

1. daß die Vermehrungshemmung eine biologische Eigenschaft des Milzbrandbazillus ist, die sich auch in normaler Nährbrühe zeigt, so daß die Befunde, wie sie von Wyssokowitsch und E. Singer durch fortlaufende Keimzählungen aus dem strömenden Blute erhoben wurden, mit den Keimzählungen übereinstimmen, die aus Nährbrühe erzielt werden;
2. daß ein Milzbrandstamm umso leichter der Vermehrungshemmung im Blutserum unterliegt, je virulenter er ist. Hierdurch ließe sich erklären, daß auch im empfänglichen Tierkörper der virulente Stamm sich an der Infektionsstelle rasch dem Nachweis entzieht im Gegensatz zum weniger virulenten und zum avirulenten Stamm, ebenso zum virulenten Stamm im unempfindlichen Tierkörper.

Es war allerdings eine Frage, ob die tierischen Milzbrandbazillen sich ebenso verhalten wie die Kulturbazillen. Deshalb habe ich einige Versuche gemacht, deren Anordnung mit derjenigen von Haag und Schlüter übereinstimmt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 1.

Versuchsanordnung:

Stamm VII.

Tierischer Stamm: Maus nach 25 Stunden gefallen, 1 Tropfen Herzblut z. T. in Nährbrühe, z. T. in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.

Kulturstamm: Brühekultur, 24stündig, in Nährbrühe verdünnt.

Die Proben werden im Wasserbad bei 37° gehalten. Zahl der Keime in ccm.

Tabelle 1.

Zeit der Entnahmen:	1. Tierstamm 1 : 25 000 Nährbrühe:	2. Tierstamm 1 : 25 000 Kochsalzlösung:	3. Tierstamm 1 : 25 000 Nährbrühe:	4. Tierstamm 1 : 25 000 Kochsalzlösung:	5. Kulturstamm: 1 : 100 000 Kochsalzlösung:
sofort	640	704	74	78	58
nach 1/4 Std.	512	576	56	3	16
„ 1 „	155	205	5	1	0
„ 3 „	34	289	3	0	0
„ 4 1/2 „	35	576	2	0	0
„ 6 „	25	4032	0	0	0
„ 20 „	u.	u.	9600	0	u.
„ 30 „	u.	u.	u.	0	u.
„ 72 „	u.	u.	u.	u.	u.

u. = unendlich.

Weitere Untersuchungen mit anderen Stämmen zeigten ähnliche Ergebnisse.

Es zeigt sich demnach, daß kein Unterschied zwischen den von Haag und Schlüter für Kulturmilzbrand und den von mir für tierischen Milzbrand gefundenen Ergebnissen besteht. Dies deckt sich mit den Untersuchungen von E. Singer (9), der bei intravenöser Injektion zwischen tierischen Milzbrandbazillen und Brühebazillen keinen wesentlichen Unterschied bei Keimzählungen aus dem strömenden Blut fand. Da Haag die Erscheinungen der Vermehrungshemmung in der Nährbrühe als einen aktiven Vorgang der Keime auffaßt, so könnte sich das Verschwinden der Milzbrandbazillen aus dem infizierten Gewebe (Subkutis, Peritoneum, Blutbahn) ebenfalls als ein aktiver Vorganz der Bazillen erklären lassen, indem das retikulo-endotheliale System aufgesucht wird, wo kein Kampf stattfindet, sondern wo wichtige aktive Umwandlungen vor sich gehen (5), die als Strukturänderungen zur Anpassung an den tierischen Organismus zu deuten sind. Dafür spricht nicht nur das negative Züchtungsergebnis aus der Infektionsstelle, sofern nur geringe Keimmengen zur Verwendung gelangen, sondern auch die Gleichstimmigkeit der mikroskopischen Untersuchung mit dem Züchtungsergebnis.

Tatsächlich besteht eine Gegensätzlichkeit im Infektionsgeschehen: entweder verschwindet der Erreger ohne Leukotaxis rasch aus dem infizierten Gewebe, um sich anscheinend, wie die ausführlichen Versuche von E. Singer ergeben, im retikuloendothelialen System anzusiedeln — so verhalten sich die virulenten Bazillen im empfänglichen Tier — oder es kommt zu einer stürmischen Leukozytenzuwanderung; die gut erhaltenen Bazillen werden massenhaft phagozytiert — so verhalten sich, wie schon Metschnikoff an seinen Kaninchenversuchen nachgewiesen und die spätere Erfahrung immer wieder bestätigt hat, die abgeschwächten Milzbrandbazillen im empfänglichen Tier und die virulenten Bazillen im resistenten Wirt — vergl. v. Baumgarten (3), Haag (5, 6), Metschnikoff (7), Nutall (8).

2. Ueber den Bazillengehalt der Organe der weißen Maus während des Infektionsverlaufes.

Nach den Untersuchungen von E. Singer einerseits und F. E. Haag andererseits, die beide den Infektionsverlauf im Meerschweinchen untersucht haben, steht demnach fest, daß vor allem die Milz, aber auch die anderen Organe mit retikulo-endothelialem Gewebe, Angriffspunkte des Milzbrandbazillus sind und eine wichtige Bedeutung für den Infektionsverlauf besitzen, wenn auch beide Forscher diese Tatsache sehr verschieden erklären. Es war deshalb von Wichtigkeit, festzustellen, von welchem Zeitpunkt ab sich Milzbrandbazillen in diesen Organen nachweisen lassen und ob sich bei der Sektion während des Infektionsablaufes irgendwelche Besonderheiten zeigen, die auf eine metastatische Verbreitung Schlüsse ziehen lassen.

Versuch 1.

Mehrere gesunde Mäuse wurden getötet[1]) und seziert. Die einzelnen Organe wurden auf Nährböden verarbeitet. Leber und Milz der Tiere enthielten Microc. pyogenes albus und aureus, teilweise auch gramnegativ nicht näher bestimmbare Stäbchen. Auf Grund dieses Befundes war die weitere Beurteilung der Er-

[1]) Man hebt die Maus mit einer Pinzette am Schwanz aus dem Glasgefäß, setzt sie auf eine feste Unterlage, umgreift mit den beiden Schenkeln einer zweiten Pinzette den Hals des Tieres und zieht mit kurzem Ruck die beiden Pinzetten auseinander. Das Tier ist sofort tot.

gebnisse insofern eingeschränkt, als etwa auftretende Zwischenformen, wie sie von Haag u. a. als Gonidien und Regenerativkörper beim Milzbrandbazillus beschrieben wurden, nicht sicher feststellbar gewesen waren. Im folgenden werden deshalb nur die typischen Milzbrandbefunde vermerkt.

Versuch 2.

7 weiße Mäuse werden dicht über der Schwanzwurzel enthaart. Die glatte Hautstelle wird mit Alkohol gereinigt, ein Punkt wird mit Karbolfuchsin markiert und unter diese bezeichnete Stelle werden je etwa 6000 Keime subkutan eingebracht. 6 Tiere werden nach 1, 2, 5, 17, 21 und 23 Stunden durch Strecken getötet, Herzblut, Milz, Leber auf Agar und in Nährbrühe gebracht und Milzstücke jeweils einer Kontrollmaus unter die Rückenhaut geschoben. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2.

Milzbrandstamm I.

Impfung am 6. 8. 30.	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 6	Tier 7
Tötung nach:	1 Std.	2 Std.	5 Std.	17 Std.	21 Std.	23 Std.	spontan 25 Std.
Infektionsstelle:							
Agar:	0	0	0	0	0	0	+
Nährbrühe:	0	0	0	0	0	0	+
Milz:							
Agar:	0	0	0	2 Kol.	verun.	12 Kol.	+++
Nährbrühe:	0	0	0	+	0	0	+
Leber:	0	0	1 Kol.	6 Kol.	3 Kol.	14 Kol.	+++
Herzblut:	0	0	0	0	0	1 Kol.	+++
Kontrollmaus: (Milzgewebe)	0	0	0	0	0	Milzbrd. tot nach 40 Std.	—

Versuch 3.

Nunmehr wird der gleiche Versuch, ebenfalls mit Milzbrandstamm I, aber mit doppelter Keimmenge, durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3.

Milzbrandstamm I.

Impfung am 13. 8. 30.	Tier 8	Tier 9	Tier 12	Tier 13	Tier 15	Tier 11	Tier 14
Tötung nach:	1 Std.	3 Std.	22 Std.	26 Std.	27 Std.	spontan 18 Std.	spontan 25 Std.
Infektionsstelle:	0	0	+	0	0	+++	+++
Milz:							
Agar:	+++	0	0	+++	0	+++	+++
Nährbrühe:	—	+ n. 14 Tg.	0	+	+ n. 13 Tg.	+	+
Leber:	++	0	0	++	0	+++	+++
Herzblut:	0	0	0	0	0	+++	+++
Kontrollmaus: (Milzgewebe)	0	0	0	Milzbrd. tot n. 8 Tg.	0	—	—

Versuch 4.

Der gleiche Versuch wird mit Stamm VII durchgeführt. Die Keimmenge entspricht derjenigen im Versuch 3. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4.

Milzbrandstamm VII.

Impfung am 19. 8. 30.	Tier 16	Tier 17	Tier 18	Tier 19	Tier 23	Tier 20	Tier 21
Tötung nach:	1 Std.	4 Std.	12 Std.	25 Std.	28 Std.	spontan 20 Std.	spontan 25 Std.
Infektionsstelle:	++	0	+	+	+	++	++
Milz:							
Agar:	0	0	++	+++	0	+++	+++
Nährbrühe:	+ n. 17 Tg.	+ n. 10 Tg.	+	+	+ n. 7 Tg.	+	+
Leber:	0	1 Kol.	++	++	0	+++	+++
Herzblut:	0	0	1 Kol.	++	0	+++	+++
Kontrollmaus: (Milzgewebe)	0	tot n. 11 Tg. kein Milzbr.	Milzbr. tot n. 5 Tg.	Milzbr. tot n. 27 Std.	0	—	—

Die Ergebnisse der Tabellen 2—4 sind unregelmäßig, vor allem wohl deshalb, weil der Infektionsverlauf bei den Tieren stark schwankt, obwohl möglichst gleichgroße Tiere zum Versuch ausgewählt worden waren. Manche Tiere leben noch nach 26 bis 28 Stunden, ihre Organe verhalten sich wie diejenigen der nach 3 bis 4 Stunden getöteten Tiere, andere Tiere sterben schon nach 18 und 20 Stunden spontan an Milzbrand. Eine Erklärung hierfür ergibt vielleicht die Tatsache, daß die Tiere verschiedenen Zuchten entstammen und darum verschiedene Resistenz aufweisen könnten.

Trotzdem ergeben sich wichtige Befunde. Bei Tier 1—3 blieben zwar die Milzausstriche auf Agar steril, auch die mit Milzgewebe beimpften Brühekulturen zeigten keine typischen Milzbrandbazillen, sie zeigten aber nach 8—20 Tagen Kugelformen und nach Monaten dazwischen milzbrandartige Stäbchen, die trotz aller Abimpfungen keine typischen Kulturen gaben, andererseits auch keine Virulenz für weiße Mäuse aufwiesen. Dagegen zeigte die Milz der Tiere 9, 15, 16, 17 und 23, daß sie zum Teil 1—4 Stunden nach der Infektion schon den Milzbranderreger enthalten haben müssen, wenn auch in einer Form, die erst nach 7—17 Tagen in der Nährbrühe zur Entwicklung typischer, virulenter Milzbrandbazillen führte.

Weiterhin zeigt sich, daß Milzgewebe, welches schon vor der Ueberflutung aller Gewebe und des Blutes mit Milzbrandbazillen typisch züchtbare Bazillen enthält, auf frische Mäuse überimpft, eine herabgesetzte Virulenz besitzt, ein Verhalten, auf das schon Haag (5) aufmerksam gemacht hat. Diese Virulenz ist unabhängig von der in der Milz enthaltenen Bazillenmenge, sie ist umso geringer, je entfernter der Zeitpunkt des mutmaßlichen spontanen Milzbrandtodes ist. Das geht aus folgender Zusammenstellung hervor:

Tabelle 5, nächste Seite.

Die zahlreichen mikroskopischen Untersuchungen der einzelnen Gewebe ergaben entsprechend der Züchtung sehr unregelmäßige Befunde, die im allgemeinen mit denen der Züchtung übereinstimmen. In den Milzausstrichen, deren Abimpfung nur in der Nährbrühe, und zwar erst nach längerer Zeit, Milzbrandbazillenbefunde aufweisen, war trotz mühevollster Untersuchung nichts Auffälliges zu finden. An der Infektionsstelle lassen sich vielfach deformierte Bazillen und grampositive Kugeln feststellen, doch geben die Befunde im Gewebe keine sichere Auskunft über das morphologische Schicksal der Bazillen.

Tabelle 5.

Nummer des Versuchstiers:	Inkubationszeit:	Das mit Milzgewebe geimpfte Kontrolltier stirbt nach:	
19	25 Std.	27 Std.	
6	23 Std.	40 Std.	
13	26 Std.	8 Tagen	
18	12 Std.	5 Tagen	
17	4 Std.	11 Tagen	unklarer bakteriologischer Befund, sehr starke Milzschwellung
8	1 Std.	stirbt nicht,	obwohl die verimpfte Milz zahlreiche virulente Bazillen enthält

3. Das Verhalten der Organe während der Inkubationszeit.

Während alle übrigen Organe bei den getöteten Tieren trotz genauester Untersuchung keine Besonderheiten aufwiesen, zeigte die Milz eine starke Schwellung und dunkelrote Verfärbung und zwar schon eine Stunde nach der Impfung. Die Schwellung nahm später wieder ab, um beim natürlichen Tode wieder mäßige Zunahme zu zeigen. Dies geht aus Tabelle 6 hervor. Als Maßstab der Milzschwellung dient hier die Länge der Milz unter Berücksichtigung der Breite und der Verfärbung.

Während die normale Milz etwa 9—10 mm lang ist, schwillt sie kurz nach der Impfung auf das Doppelte an (durchschnittlich 19 mm). Die Schwellung geht während der weiteren Inkubationszeit deutlich zurück, die durchschnittliche Länge beträgt dann 15 mm, um nach dem spontanen Milzbrandtod durchschnittlich 17 mm zu betragen. Der histologische Befund (Dozent Dr. Schleußing) zeigt nach dreistündiger Inkubationszeit eine sehr starke Hyperaemie, sonst aber keine Besonderheit. Außer dieser primären Milzschwellung war kein auffälliger Befund zu erheben.

Tabelle 6.

Stunden:	Inkubationszeit in Stunden: 1	1	1	2	3	4	5	12	17	18	21	22	23	25	26	27	27	28	spontan tot:			
Tier Nr.																						
Versuch 2	1			2			3		4		5		6						7			
Versuch 3		8			9					10		12			13	15				11	14	
Versuch 4			16			17		18						19			22	23				20
																						21
Länge der Milz in mm:																						
Versuch 2	20			22			20		11		13		15						15			
Versuch 3	20	25			15					11		18			18					17	18	
Versuch 4			14			20		17						15			18	18				18
																						18
Durchschnittslänge der Milz:		19 mm									15 mm									17 mm		

4. Weitere Untersuchungen über das Verhalten der Organe nach dreistündiger Infektionszeit.

Die Tatsache, daß die Milz der Tiere 9, 15, 16, 17 und 23 Milzbranderreger enthielt und zwar z. T. sicher schon kurz nach der Infektion, und daß diese Erreger sich erst nach längerer Zeit als typische virulente Milzbrandbazillen identifizierten, gab die Veranlassung zu einer weiteren ausgedehnten Untersuchung über das Verhalten der Organe nach dreistündiger Infektionszeit. Wenn auch die Ueberimpfungen von Milzgewebe auf frische Tiere auf Grund der vorhergehenden Befunde kurz nach der Infektion keine besonderen Erfolge versprachen (s. Tabelle 5), so wurden sie doch zur Unterstützung der Versuchsreihe mit herangezogen, ebenso die Untersuchung von Leber und Herzblut und die Untersuchung der Infektionsstelle. Blut, Leberstückchen und Milzstückchen wurden je dreifach in gewöhnliche Nährbrühe gebracht und unter zeitweiligem Zusatz neuer, verdünnter Nährbrühe 1½ Jahre lang beobachtet, während die Plattenkulturen nach etwa 5 Tagen abgestellt wurden. Die Untersuchungen, die von August 1930 bis Dezember 1931, zum Teil bis Mai 1932, durchgeführt wurden, sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Die Tabelle 7 zeigt zunächst, daß sechs verschiedene Milzbrandstämme für 49 Tierversuche verwendet wurden. An der Infektionsstelle sind bei großen Impfmengen meist Milzbrandbazillen aufzufinden und sie wären vielleicht in allen Fällen vorhanden, wenn in allen Fällen Brühekulturen des breit ausgeschnittenen subkutanen Gewebes und des Einstichkanals angelegt worden wären. Jedenfalls zeigen die Tiere 64, 65 und 69 den Vorteil der Brühekultur gegenüber dem Agarausstrich bei geringeren Keimmengen, andererseits ergeben sie aber keine Kontrolle über die Keimmenge. Die Milzen sind mit Ausnahme der Tiere 43 und 63, bei denen die Kontrollaussaat in Agar 5 bezw. 17 Keime anzeigte, deutlich vergrößert und hyperämisch. Ihre durchschnittliche Länge beträgt 20 mm. Wenn man die Tabelle überfliegt, so hat man den Eindruck, daß die Organe nach dreistündiger Inkubationszeit im allgemeinen von der Infektion noch nicht berührt sind, wenn nicht die spärlichen Befunde von Milzbrandbazillen, die in den aufbewahrten Röhrchen zum Teil nach sehr langer Zeit auftraten, gegen diese Annahme sprechen würden.

Man könnte nun denken, daß es sich um spärliche Stäbchen handelt, die im Milz- bezw. im Lebergewebe sitzen und erst bei der Zersetzung der Gewebsstückchen in der Brühe freiwerden und

Tabelle 7.

Milzbrd.-Stamm	Keimzahl	Tier Nr.	Milz: Länge mm	Milz: Agar	Milz: Brühe	Ueberimpfung nach dreistündiger Inkubationszeit: Kontrollmaus	Leber: Agar	Leber: Brühe	Herzblut: Agar	Herzblut: Brühe	Impfstelle: Agar	Impfstelle: Brühe
VII	480 000	24	20	0	0	tot n. 3 Mon.	0	0	0	0	+++	—
VII	24 000	25	20	0	0	0	0	+	0	+	+++	—
VII	12 000	29	19	0	0	tot n. 2 Mon.	0	0	0	0	++	—
VII	75	27	23	0	0	0	0	0	0	0	0	—
VII	4	28	20	0	+	0	0	0	0	0	0	—
I	200 000	29	23	0	0	0	0	0	0	+ n. 3 Tg.	+++	—
I	10 000	30	20	0	+ n. 11 Tg.	0	0	+ n. 60 Tg.	0	+ n. 11 Tg.	+	—
I	660	31	23	0	0	0	0	0	0	0	+	—
I	64	32	23	0	0	tot n. 45 Tg.	0	0	0	0	0	—
I	4	33	20	0	0	0	0	0	0	0	0	—
I	350 000	34	24	0	0	0	0	0	0	0	+++	—
I	25 000	35	17	0	0	0	0	0	0	0	++	—
I	1600	36	28	0	0	0	0	0	0	0	0	—
I	133	37	21	0	0	0	0	0	0	0	0	—
I	10	38	25	0	0	0	0	0	0	0	0	—
Pseudo-Milzbrand	400 000	39	18	0	0	—	++	++	0	0	+++	—
Pseudo-Milzbrand	40 000	40	19	0	0	—	0	0	0	0	0	—
Pseudo-Milzbrand	2000	41	25	0	0	—	0	0	0	0	++	—
Pseudo-Milzbrand	100	42	20	0	0	—	0	0	0	0	+	—
Pseudo-Milzbrand	5	43	12	0	0	—	0	0	0	0	0	—
I	150 000	44	23	0	0	tot n. 3½ Mon.	0	0	0	+	+++	—
I	9500	45	17	0	0	0	0	0	0	0	+	—
I	1000	46	19	0	0	tot n. 12 Tg.	0	0	0	0	++	—
I	144	47	18	0	0	0	++	0	0	0	+	—
I	10	48	24	0	0	tot n. 2½ Mon.	0	+ n. 6 Mon.	0	0	0	—
IX	45 000	49	20	0	0	0	0	0	0	0	+++	—
IX	3000	50	19	0	0	0	0	0	0	0	0	—
IX	190	51	19	0	0	0	0	0	0	0	++	—
IX	7	52	22	0	+	0	0	0	0	0	+	—
IX	?	53	20	0	0	0	0	0	0	0	0	—
XI	400 000	54	20	0	0	tot n. 2 Mon.	0	0	0	0	+++	—
XI	24 000	55	20	+	0	0	0	0	0	0	+++	—
XI	1300	56	20	0	0	tot n. 19 Tg. Milzbrd.	0	0	0	0	+++	—
XI	76	57	25	0	0	0	0	0	0	0	++	—
XI	3	58	18	0	0	0	0	0	0	0	—	—
XI	200 000	59	18	0	0	0	0	0	0	0	+++	—
XI	20 000	60	18	0	0	0	0	0	0	0	+++	—
XI	2000	61	17	0	0	tot n. 1 Mon.	0	0	0	0	0	—
XI	208	62	16	0	0	0	0	0	0	0	0	—
XI	17	63	14	0	0	0	0	+ n. 14 Mon.	0	0	0	—
X	6600	64	—	0	0	—	—	—	—	—	0	+ n. 3 Tg.
X	600	65	—	0	0	—	—	—	—	—	0	+ n. 3 Tg.
X	66	66	—	0	0	—	—	—	—	—	+	+
XI	120 000	67	—	0	0	—	—	—	—	—	++	+
XI	12 000	68	—	0	0	—	—	—	—	—	+	+
XI	1200	69	—	0	0	—	—	—	—	—	0	+ n. 4 Tg.
IX	150 000	70	—	0	0	—	—	—	—	—	+++	+++
IX	15 000	71	—	0	0	—	—	—	—	—	+++	+++
IX	1500	72	—	0	0	—	—	—	—	—	+++	+++

sich vermehren. Aber einmal bleiben diese Gewebsstückchen unzersetzt, vor allem aber sind auch unter den Blutkulturen 4 Fälle vorhanden, die erst nach längerer Zeit Milzbrandbazillen enthalten. Interessant ist in dieser Hinsicht der Befund von Maus 30, deren Blut- und Milzkultur erst nach 11 Tagen und deren Leberkultur nach 60 Tagen sich vermehrende Milzbrandbazillen enthielt. Hinzu kommt, daß viele der keine Milzbrandbazillen entwickelnden Kulturen nach mehr oder weniger langer Keimfreiheit einen feinen, immer stärker werdenden Bodensatz entwickelten, dessen Ausstrich und mikroskopische Untersuchung zartwachsende Kugelformen zeigten, die aber späterhin üppigwachsende gelbe und weiße grampositive Kugelkolonien lieferten, die in nichts von Staphylokokkus albus und aureus zu unterscheiden waren. Nicht selten bildeten sich auch Stäbchenformen, die milzbrandähnliche Kulturen bildeten, aber nicht zu typischen Milzbrandbazillen auswuchsen. Ob sie zum Formkreise des Milzbrandbazillus gehören oder Verunreinigungen darstellen, ließ sich nicht entscheiden. Einerseits könnte es sich um Formen handeln, wie sie von H a a g (4) nachgewiesen wurden, andererseits könnten sie als Verunreinigungen die Entwicklung der Milzbrandbazillen verhindert haben.

Neun mit Milzgewebe beimpfte Tiere starben nach verschieden langer Zeit, zwischen 12 und 15 Tagen. Mit Ausnahme des Kontrolltieres 56 entsprechen die Befunde denen des Kontrolltieres 17 (vergl. Tabelle 5), das eine sehr starke Milzschwellung und einen unklaren bakteriologischen Befund zeigte. Zum Teil weist die Milz bei diesen 8 Tieren 35 mm lange und 8 mm breite Milzen auf, aus denen sich grampositive Kugel- und gramschwankende Stäbchenformen züchten ließen, aber keine Milzbrandbazillen. Nur das Kontrolltier 56 lieferte nach 19tägiger Inkubationszeit typische virulente Milzbrandkulturen, während keine einzige der Züchtungen aus dem Ausgangstier 56 einen Milzbrandbefund aufzuweisen hatte.

Ebenso wie in zahlreichen Röhrchen gelegentlich milzbrandverdächtige Befunde erhoben wurden, die sich bei weiterer Züchtung als trügerisch erwiesen, so waren fast alle mit Milzgewebe geimpften Tiere eine Zeitlang deutlich krank und struppig. Die meisten Tiere überstanden aber diese Zeitspanne (26 von 35 Tieren).

In Tabelle 8 sind die positiven Befunde zusammengestellt, soweit sie sich erst später als nach 1—3 Tagen einstellten. Es findet sich nicht die geringste Regelmäßigkeit, weder nach Stamm noch nach Zeit noch nach der subkutan eingebrachten Keimzahl.

Tabelle 8.

Lfd. Nr.:	Milzbrand-stamm:	Tier Nr.:	Keimzahl:	Organ:	Inkubations-zeit:	Organaus-strich sofort n. Sektion:	Positiv nach:
1	I	9	etwa 12 000	Milz	3 Std.	negativ	14 Tagen
2	I	15	etwa 12 000	Milz	27 „	„	13 „
3	VII	16	etwa 12 000	Milz	1 „	„	17 „
4	VII	17	etwa 12 000	Milz	4 „	„	10 „
5	VII	23	etwa 12 000	Milz	28 „	„	7 „
6	VII	25	etwa 24 000	Herzblut	3 „	„	18 „
7	VII	25	etwa 24 000	Leber	3 „	„	14 Monaten
8	VII	28	4	Milz	3 „	„	58 Tagen
9	I	29	etwa 200 000	Herzblut	3 „	„	3 „
10	I	30	etwa 10 000	Herzblut	3 „	„	11 „
11	I	30	etwa 10 000	Milz	3 „	„	11 „
12	I	30	etwa 10 000	Leber	3 „	„	60 „
13	I	44	etwa 150 000	Herzblut	3 „	„	9 „
14	I	48	10	Leber	3 „	„	6 Monaten
15	IX	52	7	Milz	3 „	„	12 „
16	XI	56	etwa 1300	Milz	3 „	„	im Tierver-such n. 19 Tg.
17	XI	63	17	Leber	3 „	„	14 Monaten
18	XI	69	etwa 1200	Injektions-stelle	3 „	„	4 Tagen

Zusammenfassung.

1. F. E. Haag und E. Schlüter haben gezeigt, daß in Nährbrühe eingeimpfte Milzbrandbazillen zunächst eine Vermehrungshemmung aufweisen; ist die Zahl der eingesäten Bazillen gering, so fehlt die Ueberimpfbarkeit nach 2—3 Stunden vollkommen. Dieser Zustand tritt umso eher ein, je virulenter der Milzbrandstamm ist. Von mir durchgeführte Untersuchungen zeigen, daß nicht nur Kulturbazillen, sondern auch tierische Bazillen dieses Verhalten aufweisen (Tabelle 1).

2. Auch die in den Körper der Versuchstiere eingeführten Milzbrandbazillen zeigen die gleiche Erscheinung: ob man Meerschweinchen intraperitoneal (Bail und Deutsch) oder subkutan (Haag) oder Kaninchen intravenös (Wyssokowitsch, Bail, Singer) infiziert, stets nimmt die Keimmenge an der Impfstelle nicht zu, sondern ganz beträchtlich ab. Verwendet man geringe Mengen hochvirulentener Milzbrandbazillen, so lassen sich weder kulturell noch mikroskopisch Milzbrandbazillen finden. Gleiche Untersuchungen an weißen Mäusen bei subkutaner Infektion mit verschiedenen Milzbrandstämmen ergaben, daß bei Verwendung kleiner Keimmengen (Tabelle 2) die Infektionsstelle frei von abimpfungsfähigen Bazillen wird, während bei Verwendung größerer Keimmengen (Tab. 3 u. 4) unregelmäßige Befunde auftreten.

3. Die Bazillenbefunde in den Mäuseorganen (subkutanes Gewebe und Einstichstelle, Leber, Milz, Blutbahn) während des Infektionsablaufes sind sehr spärlich und unregelmäßig. Daß der Tierkörper aber schon in den ersten Stunden nach der Impfung auf die Infektion antwortet, zeigt die starke Milzschwellung, die in dieser Zeit vorhanden ist, die später zurückgeht und kurz vor dem Tode wieder zunimmt, dabei aber nicht die Ausmaße der primären Schwellung erreicht. Weiterhin zeigte sich in 18 Fällen, daß sich aus einem anfänglichen sterilen Gewebe nach Wochen und Monaten virulente typische Milzbrandbazillen entwickeln können, daß dieses Gewebe also in Wirklichkeit nicht steril war, sondern Milzbranderreger in einer auf den Nährböden einige Zeit lang nicht vermehrungsfähigen Form enthielt (Tabelle 8).

4. Auch Ueberimpfungen von Milzstückchen unter die Rückenhaut von frischen Mäusen lieferten merkwürdige Ergebnisse. Die Infektion verlief umso atypischer, je ferner der voraussichtliche Infektionstod des sezierten Tieres war, dessen Milz überimpft wurde (Tabelle 5).

5. Für die Deutung dieser Befunde bleibt nur die Annahme übrig, daß der in das Versuchstier eingeimpfte Milzbrandbazillus irgend eine Zustandsänderung vollzieht, die mit den üblichen Züchtungsmethoden vorderhand nicht genügend erfaßbar ist.

Es ist mir ein großes Bedürfnis, zum Schluß der Arbeit meinem verehrten Lehrer und Förderer, Herrn Priv.-Doz. Dr. Friedr. Erh. Haag, meinen herzlichen Dank auszusprechen für die vielseitigen Anregungen und Hinweise, die mir zum Gedeihen meiner wissenschaftlichen und menschlichen Denkungsweise förderlich waren.

Auch dem Direktor des Hygienischen Instituts in Düsseldorf, Herrn Professor Manteufel, bin ich zu großem Dank verpflichtet für das rege Interesse, das er für das Wachsen meiner Arbeit hegte.

Schrifttum.

1. Bail, Oskar: Versuch eines natürlichen Systems der bakteriellen Infektionen. Jahresbericht über die Ergebnisse der Immunitätsforschung und deren Grenzwissenschaften, der Chemotherapie, Zoonosologie, Hygiene u. s. f. von Wolfgang Weichardt. Bd. 7, Abtl. I; Ergebnisse der Immunitätsforschung. S. 91—138, 1911.

2. Bail, Oskar und Weil, Edmund: Beiträge zum Studium der Milzbrandinfektion. Archiv für Hygiene. Band 73, S. 218—264. München und Berlin 1911.

3. v. Baumgarten, P.: Lehrbuch der pathogenen Mikroorganismen. 955 Seiten. Verlag S. Hirzel, Leipzig 1911.

4. Haag, F. E.: Der Milzbrandbazillus, seine Kreislaufformen und Varietäten. Archiv für Hygiene, Band 98, S. 271—318. München und Berlin 1927.

5. Haag, F. E.: Der Milzbrandbazillus im Tierkörper. Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. I. Abtlg., 110. Bd. Originale. Beiheft S. 58 bis 60. Jena 1929.

6. Haag, F. E. und Schlüter, E.: Ueber Anthrakozidie. Archiv für Hygiene, Band 107. München und Berlin 1932.

7. Metschnikoff, E.: Die Lehre von den Phagozyten und deren experimentelle Grundlagen. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Dr. W. Kolle und Dr. A. v. Wassermann. Zweiter Band, erste Hälfte. S. 655—731. 2. Auflage. Jena 1913.

8. Nutall, Geo.: Experimente über die bakterienfeindlichen Einflüsse des tierischen Körpers. Zeitschrift für Hygiene, Band 4, S. 353—394. Leipzig 1888.

9. Singer, E.: Milzbrandstudien. Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie, Bd. 43, S. 285—311. Jena 1925.

10. Singer, E.: Milzbrandstudien. Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie, Bd. 45, S. 12—26. Jena 1926.

11. Singer, E.: Milzbrandstudien. Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie, Bd. 49, S. 284—303. Jena 1927.

12. Sobernheim, G.: Milzbrand. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von W. Kolle und A. v. Wassermann. Neu herausgegeben von W. Kolle, R. Kraus und P. Uhlenhuth. Dritter Band, zweiter Teil, S. 1041—1174. 3. Aufl. Jena, Berlin und Wien 1931.

13. Wyssokowitsch, W.: Ueber die Schicksale der ins Blut injizierten Mikroorganismen im Körper der Warmblüter. Zeitschrift für Hygiene, Bd. 1, S. 3—46. Leipzig 1886.

LEBENSLAUF.

Am 4. September 1907 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Ernst Hübel in Wuppertal-Elberfeld geboren. Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in Wuppertal-Vohwinkel kam ich Ostern 1917 zur Realschule dortselbst, an der ich Ostern 1923 die Einjährigen-Reife erhielt. Während meiner letzten drei Schuljahre besuchte ich die Oberrealschule-Nord in Wuppertal-Elberfeld, wo ich auch Ostern 1926 die Reifeprüfung ablegte.

Mein erstes Semester verbrachte ich in Köln; die folgenden 5 in Rostock; dort bestand ich am 9. November 1928 das Physikum. Nach einem Semester in Graz kehrte ich für ein weiteres nach Rostock zurück, um dann den Rest meiner Studienzeit, 3 Semester, an der Medizinischen Akademie in Düsseldorf zu verbringen. Hier bestand ich am 12. Dezember 1931 das medizinische Staatsexamen.